

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 3 月 21 日 (21.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/22665 A1

(51) 国際特許分類: C07K 14/075, C12N 15/12, C12P  
21/02, A61K 38/17, C07K 16/28, G01N 33/53, 33/55,  
A61K 45/00, A61P 25/00, C12Q 1/68, G01N 33/566

行 (MIYAJIMA, Nobuyuki) [JP/JP]: 〒305-0031 茨城  
県つくば市吾妻4-16-4 プレビュー吾妻403号 Ibaraki  
(JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/07833

(74) 代理人: 小林純子, 外 (KOBAYASHI, Sumiko et al.):  
〒104-0028 東京都中央区八重洲2丁目8番7号 福岡ビ  
ル9階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2001 年 9 月 10 日 (10.09.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, FE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-280137 2000 年 9 月 11 日 (11.09.2000) JP  
特願2001-132920 2001 年 4 月 27 日 (27.04.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品  
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,  
LTD.) [JP/JP]: 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町  
四丁目1番1号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 守谷 岳郎  
(MORIYA, Takeo) [JP/JP]: 〒562-0001 大阪府箕面市  
箕面8丁目12-6 Osaka (JP). 伊藤 隆司 (ITO, Takashi)  
[JP/JP]: 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番  
地9 武田春日ハイツ704号 Ibaraki (JP). 新谷 靖  
(SHINTANI, Yasushi) [JP/JP]: 〒532-0033 大阪府大阪  
市淀川区新高6丁目14番8-A606号 Osaka (JP). 宮嶋 伸

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEINS AND DNAS THEREOF

(54) 発明の名称: 新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質およびそのDNA

(57) Abstract: It is intended to search for novel G protein-coupled receptor proteins and clarify the function thereof. More partic-  
ularly, novel G protein-coupled receptor proteins having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as an  
amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, 5 or 11, or salts thereof; polynucleotides encoding the same; and medicinal use,  
etc. thereof.

(57) 要約:

本発明は新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を検索し、その機能を  
解明することを目的とする。

本発明は新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を検索し、その機能を解明することを目的とする。  
本発明は新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を検索し、その機能を解明することを目的とする。  
本発明は新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を検索し、その機能を解明することを目的とする。

WO 02/22665 A1

## 明細書

## 新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質およびそのDNA

## 技術分野

- 5      本発明は、ヒト精巣および胎盤由来の新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩およびそれをコードするDNA、当該レセプタータンパク質のリガンド、さらにはこれらのスクリーニング方法等に関する。

## 背景技術

- 10      多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプタータンパク質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプタータンパク質のうち多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein（以下、Gタンパク質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行い、また、7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていること  
15      から、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質あるいは7回膜貫通型レセプタータンパク質（7TMR）と総称される。

Gタンパク質共役型レセプタータンパク質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えば、ホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。

- 20      レセプターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプタータンパク質、特にGタンパク質共役型レセプタータンパク質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に  
25      関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行われている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプタータンパク質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未知

のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプタータンパク質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプタータンパク質においてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

- 5 生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプタータンパク質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプタータンパク質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプタータンパク質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であ
- 10 った。

- 近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行われており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を
- 15 推定することは困難である。

- 従来、Gタンパク質共役型レセプターと生理活性物質（すなわち、リガンド）との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質（すなわち、リガンド）と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた
- 20 。従って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるGタンパク質共役型レセプタータンパク質を新規に見出し、その遺伝子（例えばcDNA）をクローニングすることは、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

- 25 しかし、Gタンパク質共役型レセプターはその全てが見出されているわけではなく、現時点でもなお、未知のGタンパク質共役型レセプター（また対応するリ

、新たなGタンパク質共役型レセプターの探索および機能解明が切望されている。

。

- Gタンパク質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たな生理活性物質（すなわち、リガンド）の探索、また、当該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストの探索に有用である。一方、生理的なリガンドが見出されなくても、該レセプターの不活化実験（ノックアウト動物）から該レセプターの生理作用を解析することにより、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストを作製することも可能である。これらGタンパク質共役型レセプターに対するリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、Gタンパク質共役型レセプターの機能不全に関連する疾患の予防・治療薬や診断薬として活用することが期待できる。
- さらにまた、Gタンパク質共役型レセプターの遺伝子変異に基づく、生体での該レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内（またはある特定の臓器）への導入や、該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に応用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関与する疾患の予防・治療薬や診断薬に応用することもできる。
- 本発明は、上記のように有用な新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を提供するものである。すなわち、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）を含有するポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩の製造法、該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物、該Gタンパク質共役型レセプターに対するリガンドの決定方法、リガンドと該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質との



- 結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られうるリガンドと該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）
- 5 またはその塩、およびリガンドと該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）もしくは該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

#### 10 発明の開示

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト精巣および胎盤由来の新規なGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAを単離し、その全塩基配列を解析することに成功した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

#### 15 すなわち、本発明は、

（1）配列番号：1、配列番号：5または配列番号：11で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩、

（2）配列番号：1、配列番号：5または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩、

20

（3）上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

（4）上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

25

（5）DNAである上記（4）記載のポリヌクレオチド、

（7）上記（4）記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

(8) 上記(7)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、

(9) 上記(8)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を生成せしめることを特徴とする上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩の製造法、

5 (10) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(11) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(12) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

10 (13) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である上記(12)記載の抗体、

(14) 上記(12)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(15) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる上記

15 (1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンド、

(16) 上記(15)記載のGタンパク質共役型レセプターのリガンドを含有してなる医薬、

(17) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは  
20 上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

(18) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは  
上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンド  
25 と上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(19) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは  
上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンド  
と上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩と

の結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

- (20) 上記(18)記載のスクリーニング方法または上記(19)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(21) 上記(18)記載のスクリーニング方法または上記(19)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

- 10 (22) 上記(4)記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(23) 上記(4)記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、

- 15 (24) 上記(4)記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のmRNAの定量方法、

(25) 上記(12)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の定量方法、

- 20 (26) 上記(24)または(25)記載の定量方法を用いることを特徴とする上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプターの機能が関連する疾患の診断方法、

(27) 上記(24)記載の定量方法を用いることを特徴とする上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 25 (28) 上記(25)記載の定量方法を用いることを特徴とする細胞膜における上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化

) 記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物

またはその塩、

(30) 上記(28)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化合物またはその塩、

- 5 (31) 上記(27)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

- (32) 上記(28)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- 10

(33) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記(17)記載のリガンドの決定方法、

- (34) (i) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、(ii) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行うことを特徴とする上記(18)記載のスクリーニング方法、
- 15

- (35) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- 20
- 25

(36) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(37) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(38) (i) 標識したリガンドを上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したGタンパク質共役型レセプタータンパク質に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したGタンパク質共役型レセプタータンパク質に接触させた場合における、標識したリガンドの該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(39) (i) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物を上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 上記(1)記載のG

試験化合物を上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質

を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- （４０）上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物を上記（８）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したＧタンパク質共役型レセプタータンパク質に接触させた場合と、上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記（８）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したＧタンパク質共役型レセプタータンパク質に接触させた場合における、Ｇタンパク質共役型レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- （４１）上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質を活性化  
する化合物が、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドＹ、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP 27, PACAP 38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ・インテスティナル・ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF4, IP-10, Mig, PBSF/SDF-1などのCX Cケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , HCC-1, MIP-3 $\alpha$ /LARC, MIP-3 $\beta$ /ELC, I-309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2, MDC, DC-C

K1 / PARC, SLCなどのCCケモカインサブファミリー; lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー; fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等)、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、  
5 ガラニン、リゾホスファチジン酸(LPA)またはスフィンゴシン1-リン酸である上記(39)または(40)記載のスクリーニング方法、

(42) 上記(34)～(41)記載のスクリーニング方法で得られうるリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

10 (43) 上記(34)～(41)記載のスクリーニング方法で得られうるリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

(44) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞を含有することを特徴とする上記(19)記載のスクリーニング用キット  
15 、

(45) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記(19)記載のスクリーニング用キット、

(46) 上記(8)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の  
20 細胞膜に発現したGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有することを特徴とする上記(19)記載のスクリーニング用キット、

(47) 上記(44)～(46)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

25 (48) 上記(44)～(46)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質

の医薬品、

(49) 上記(12)記載の抗体と、上記(1)記載のGタンパク質共役型レ

セプタータンパク質もしくは上記（３）記載の部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記（１）のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記（３）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、

（５０）上記（１２）記載の抗体と、被検液および標識化された上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記（３）記載の部分ペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記（３）記載の部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記（３）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、および

（５１）被検液と担体上に不溶化した上記（１２）記載の抗体および標識化された上記（１２）記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記（３）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法等を提供する。

#### 図面の簡単な説明

- 図１はＴＧＲ１８－１の疎水性プロット図である。
- 図２はＴＧＲ１８－２の疎水性プロット図である。
- 図３はＴＧＲ１８－３の疎水性プロット図である。
- 図４は一文字表記によるＴＧＲ１８－１のアミノ酸配列を示す図である。
- 図５は一文字表記によるＴＧＲ１８－２のアミノ酸配列を示す図である。
- 図６は一文字表記によるＴＧＲ１８－３のアミノ酸配列を示す図である。
- 図７は実施例５で行われたＴＧＲ１８の発現組織分布の解析結果を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質（以下、レセプタータンパク質と略記する場合がある）は、配列番号：１、配列番号：５または配列番号：



11で表されるアミノ酸配列(それぞれ図4、図5および図6)と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質である。

本発明のレセプタータンパク質は、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)のあらゆる細胞(例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)や血球系の細胞(例、白血球、赤血球)、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳幹、黒質)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睪丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。ただし、WO 01/02563に記載されたHP10678のアミノ酸配列を除く。配列番号：5で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：5で表されるアミノ酸配列と約80%以上、好ましくは約85%以上、より好ましくは約90%以上、

配列番号：11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とし

ては、例えば、配列番号：5で表されるアミノ酸配列と約80%以上、好ましくは約85%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

- 5 本発明の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

- 10 本発明の配列番号：5で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：5で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

- 15 本発明の配列番号：11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：11で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

- 20 実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

- 25 リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことができるが、例えば、後に記載するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明のレセプタータンパク質としては、①配列番号：1、配列番号：5または配列番号：11で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好まし

くは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1、配列番号：5または配列番号：11で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1、配列番号：5または配列番号：11で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。

- 10 本明細書におけるレセプタータンパク質は、ペプチド表記の慣例に従って、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1、配列番号：5または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質をはじめとする、本発明のレセプタータンパク質は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

- 15 ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピルもしくは $n$ -ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

- 20 本発明のレセプタータンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプタータンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

また、本発明のレセプタータンパク質は、N末端が保護基（例えば、 $t$ -ブチル基、 $t$ -ブチルエステル基、 $t$ -ブチルアミド基などの $\text{C}_{2-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、N端

側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-OH$ 、 $-SH$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの $C_{2-6}$ アルカノイル基などの $C_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のレセプタータンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するヒト胎盤由来レセプタータンパク質（TGR18-2）、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を含有するヒト胎盤由来レセプタータンパク質（TGR18-3）、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するヒト精巣由来レセプタータンパク質（TGR18-1）などが用いられる。

本発明のレセプタータンパク質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、上記した本発明のレセプタータンパク質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプタータンパク質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1、配列番号：5または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有するレセプタータンパク質の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記した本発明のレセプタータンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性

を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は上記と同様に行うことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、上記した本発明のレセプタータンパク質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のレセプタータンパク質またはその塩は、上記した哺乳動物の細胞また

後に記載する本発明の細胞培養系に培養することによって製造することができる。また、後に記載

するタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

- 哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

- 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそのアミド体を取得する。

- 上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOObtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピ

ロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $50^{\circ}\text{C}$ の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護するこ

基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また

、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、*Bz*、*Cl*<sub>2</sub>-*Bz*、2-ニトロベンジル、*Br*-*Z*、ターシャリーブチルなどが用いられる。  
5

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、*Tos*、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、*DNP*、ベンジルオキシメチル、*Bum*、*Boc*、*Trt*、*Fmoc*などが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、*HONB*、*N*-ヒドロキシスクシミド、*N*-ヒドロキシフタルイミド、*HOBT*）とのエステル〕などが用いられる。原料  
10  
15

の保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、*Pd*-黒あるいは*Pd*-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、  
20  
25  
ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行われるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理に



よっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

- 5      タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合
- 10      溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。
- 15      タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。
- 20      本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。
- 25      公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

① S. L. Friess, Interscience Publisher, New York, (1966年)

② SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New

York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 I V、205、(1977年)

5 ⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明のレセプタータンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明のレセプタータンパク質をコードする塩基配列(DNAまたはRNA、好ましくはDNA)を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNA  
15 、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(すなわち、コード鎖)であっても、アンチセンス鎖(すなわち、非コード鎖)であってもよい。

本発明のレセプタータンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のレセプタータンパク質のmRNAを定量することができる。

本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞  
25 ・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅するこ

ともできる。

具体的には、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：6または配列番号：12で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2、配列番号：6または配列番号：12で表  
5 される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを含有し、本発明のレセプタータンパク質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプタータンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな  
10 条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：6で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな  
15 条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：6で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：12で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェント  
20 な条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：12で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、  
25 モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行うことが

可能である。本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAは、上記の方法に従って行うことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20 mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

- 5 より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質TGR18-2をコードするDNAとしては、配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。また、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質TGR18-3をコードするDNAとしては、配列番号：6で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。
- 10 さらに、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質TGR18-1をコードするDNAとしては、配列番号：12で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記
- 15 の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけでなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

- 本発明に従えば、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたGタンパク質共役型レセプタータンパク質を
- 20 コードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成することができる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいはGタンパク質共役型レセプタータンパク質関連RNAとの相互作用を介してGタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子の
- 25 発現を調節・制御することができる。Gタンパク質共役型レセプタータンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、およびGタンパク質共役型レセプタータンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外でGタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療

または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（タンパク質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（タンパク質）のアミノ酸を通常指している。Gタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係、即ち、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチ

ド間、分子間、分子内、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエ

- ートなど)を持つもの、例えばタンパク質(ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・イン  
ヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリペプチドなど)や糖(  
例えば、モノサッカライドなど)などの側鎖基を有しているもの、インターカレ  
ント化合物(例えば、アクリジン、プソラレンなど)を持つもの、キレート化合  
5 物(例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など)を含有す  
るもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの(例えば、 $\alpha$   
アノマー型の核酸など)であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオ  
チド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく  
、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうし  
10 た修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンお  
よびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾された  
ヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく  
、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり  
、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。
- 15 本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド(核酸)は、RNA、DNA、ある  
いは修飾された核酸(RNA、DNA)である。修飾された核酸の具体例として  
は核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミド  
やオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定  
されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設  
20 計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、  
アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和  
性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性  
をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えばJ. Kawakami et al.,  
25 Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Croo  
ke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993など  
に開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結  
合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与

- されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。
- 15 アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはGタンパク質共役型レセプタータンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。
- 本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記した本発明の部分ペ
- 20 プチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase
- 25 Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅

具体例には、本発明の塩基配列が、例えば、以下に示される。

- 1) 配列番号：2、配列番号：6または配列番号：12で表される塩基配列を含

有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または（２）配列番号：２、配列番号：６または配列番号：１２で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを含有し、本発明のレセプタータンパク質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプタータンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：２で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：２で表される塩基配列と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：６で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：６で表される塩基配列と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：１２で表される塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：１２で表される塩基配列と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上、最も好ましくは約９５％以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチド（以下、本発明のレセプタータンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAの塩基配列の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いたPCR法による増幅、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のレセプタータンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いた標識したものとのハイブリダイゼーションによる選別があげられる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）



2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

5 DNAの塩基配列の置換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km (宝酒造)、Mutan<sup>TM</sup>-K (宝酒造) 等を用いて、ODA-LA PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行うことができる。

10 クローン化されたレセプタータンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

15 本発明のレセプタータンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のレセプタータンパク質をコードするDNA (例えば、cDNA) から目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

20 ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pCR4、pCR2.1、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19、pSH15)、入フェージなどのバクテリオフェージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、p cDNA I/Neoなどが用いられる。

25 本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿

主として用いる宿主細胞は、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞、マウス細胞、ラット細胞、ウシ細胞、豚細胞、鶏細胞、魚類細胞、昆虫細胞、植物細胞、微生物細胞等である。

これらのうち、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ P<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr<sup>-</sup>）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプタータンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*

) K 1 2 ・ D H 1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 6 0 巻, 1 6 0 ( 1 9 6 8 ) ] , J M 1 0 3 [ヌクレック・アシズ・リサーチ (Nucleic Acids Research) , 9 巻, 3 0 9 ( 1 9 8 1 ) ] , J A 2 2 1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology) , 1 2 0 巻, 5 1 7 ( 1 9 7 8 ) ] , H B 1 0 1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 4 1 巻, 4 5 9 ( 1 9 6 9 ) ] , C 6 0 0 [ジェネティクス (Genetics) , 3 9 巻, 4 4 0 ( 1 9 5 4 ) ] , D H 5 α [Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28 (1990)] , D H 1 0 B [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 8 7 巻, 4 6 4 5 - 4 6 4 9 ( 1 9 9 0 ) ]  
 などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*) M I 1 1 4 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (*Journal of Biochemistry*), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH 2 2, AH 2 2 R<sup>-</sup>, NA 8 7 - 1 1 A, DKD - 5 D、2 0 B - 1 2、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC 1 9 1 3, NCYC 2 0 3 6、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞（*Spodoptera frugiperda* cell；Sf細胞）、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five™細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞（*Bombyx mori* N；BmN細胞）な

(1977) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature) , 315巻, 592 (1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7、Ver o、チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr 遺伝子欠損チャイニ  
5 ーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (10 Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 69巻, 2110 (1972)やジーン (Gene) , 17巻, 107 (1982)などに記載の方法に従って行うことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111 (1979)などに記載の方法に従って行うことができる。

15 酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929 (1978)などに記載の方法に従って行うことができる。

20 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55 (1988) ) などに記載の方法に従って行うことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロト  
25 コール, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456 (1973)に記載の方法に従って行うことができる。

このようにして、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生

育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、

- 5 無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

- エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

- 宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間  
15 行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)」や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)」〕が挙げ  
20 げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

INSECT MEDIA (Insect Media) (Bostian, K. L. ら, 1982)

に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培

地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)〕, DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)〕, 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)〕などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を生成せしめることができる。

15 上記培養物から本発明のレセプタータンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行うことができる。

本発明のレセプタータンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりレセプタータンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にレセプタータンパク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

25 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるレセプタータンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマ

トグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

- 5      このようにして得られるレセプタータンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

- 10      なお、組換え体が産生するレセプタータンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

- 15      このようにして生成する本発明のレセプタータンパク質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

- 20      本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のレセプタータンパク質等と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のレセプタータンパク質等を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

- 25      〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のレセプタータンパク質等（以下、抗原）は、抗体産生細胞（以下、細胞）に導入し、抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジ

ュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

- 5      モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプタータンパク質
- 10    等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いら
- 15    れる。

- 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG(好ましくは、PEG1000～PEG6000)が10～80%程度の濃度で添加
- 20    され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

- モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプタータンパク質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し
- 25    、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプタータンパク質等を加え、



固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

- モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行うことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行うことができる。選別および育種用培地として
- 5 は、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃で
- 10 ある。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行うことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### （b）モノクローナル抗体の精製

- モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同
- 15 様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行うことができる。

#### 20 〔ポリクローナル抗体の作製〕

- 本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（本発明のレセプタータンパク質等の抗原）とキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のレセプタータン
- 25 パク質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造できる。

抗体に用いるキャリアタンパク質の種類およびその量、免疫動物の種類、免疫方法は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれ

ば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

- 5      また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

- 縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全  
10   フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行うことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

- 抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同  
15   様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

- 本発明のレセプタータンパク質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩、および該レセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAは  
20   、（1）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンド（アゴニスト）の決定、（2）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤、（3）遺伝子診断剤、（4）本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、（5）本発明のレセプタータンパク質または  
25   その部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、（6）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドの定量法、（7）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法、（8）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパ

- ク質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、（９）本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量、（１０）細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、（１１）細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、（１２）本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体による中和、（１３）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNAを有する非ヒトトランスジェニック動物の作出などに用いることができる。

- 特に、本発明の組換え型Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、哺乳動物に特異的なGタンパク質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

- 本発明のレセプタータンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のレセプタータンパク質等と略記する場合がある）、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）および本発明のレセプタータンパク質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）の用途について、以下に具体的に説明する。

（１）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンド（アゴニスト）の決定

- 本発明のレセプタータンパク質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンド

（以下、本発明のレセプタータンパク質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴と

する本発明のレセプタータンパク質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、P  
5 ACAP（例、PACAP 27、PACAP 38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ・インテスティナル・アンド・リレイテッド・ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）  
10 、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP-10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、HCC-1、MIP-3 $\alpha$ /LARC、MIP-3 $\beta$ /ELC、I-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCケモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3Cケモカイン  
20 サブファミリー等）、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン1-リン酸など）の他に、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上  
25 清などを本発明のレセプタータンパク質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプタータンパク質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用

いることによって、本発明のレセプタータンパク質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。

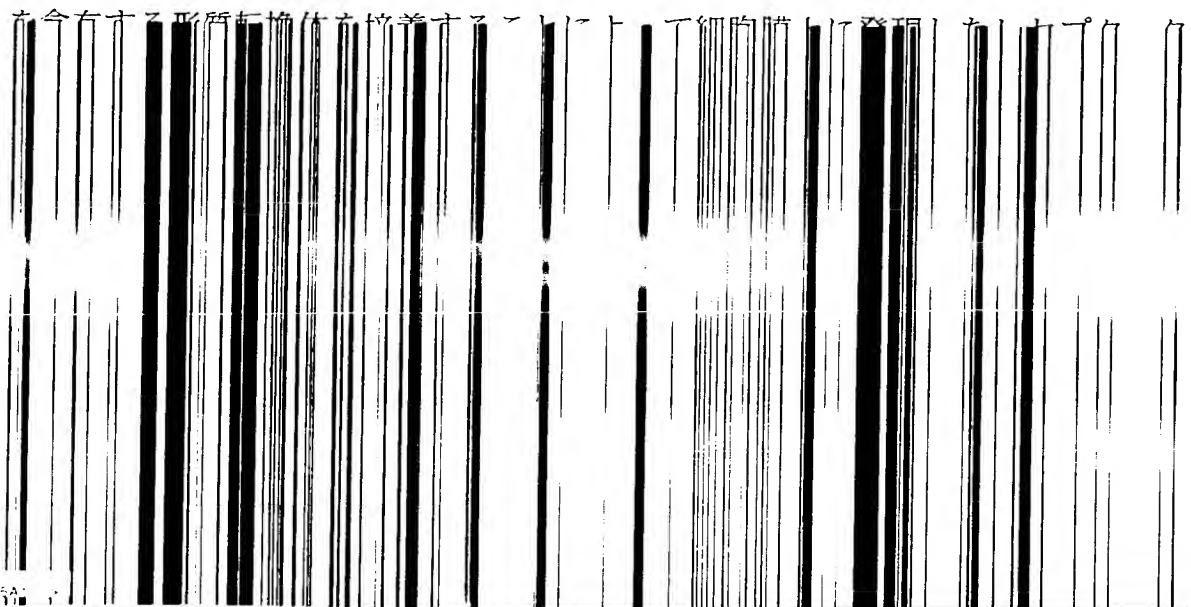
本発明のリガンド決定方法においては、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該レセプタータンパク質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

①標識した試験化合物を、本発明のレセプタータンパク質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該タンパク質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNA



胞内c G M P 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c - f o s の活性化、p H の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および

- 5      ⑤試験化合物を、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプタータンパク質に接触させた場合における、レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内C a <sup>2+</sup>遊離、細胞内c A M P 生成、細胞内c G M P 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c - f o s の活性化、p H の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行い、試験化合物が本発明のレセプタータンパク質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行うことが好ましい。

- 15      まず、リガンド決定方法に用いるレセプタータンパク質としては、上記した本発明のレセプタータンパク質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプタータンパク質が適している。

- 20      本発明のレセプタータンパク質を製造するには、上記の発現方法が用いられるが、該レセプタータンパク質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことが好ましい。目的とするタンパク質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプタータンパク質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効  
25      率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear polyhedrosis virus ; NPV）のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが

好ましい。発現したレセプターの量と質の検査は公知の方法で行うことができる。例えば、文献〔Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267巻, 19555~19559頁, 1992年〕に記載の方法に従って行うことができる。

- 5       したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有するものとしては、公知の方法に従って精製したレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩であってもよいし、該レセプタータンパク質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

- 10       本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行うことができる。

本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞としては、本発明のレセプタータンパク質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌

- 15       、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら

20       細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500rpm~3000rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000rpm~30000rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分と

- 25       する。該膜画分中には、発現したレセプタータンパク質と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

この量は、一細胞当たり100~1000分子程度であるのが好ましい。また、分子量は、100kDa以下であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合

活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の①～③の方法を実施するためには、適当なレセプタータンパク質画分と、標識

5 した試験化合物が必要である。

レセプタータンパク質画分としては、天然型のレセプタータンパク質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

- 10 標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP 27, PACAP 38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアク
- 15 ティブ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF4, IP-10, Mig, PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , HCC-1, MIP-3 $\alpha$ /LARC, MIP-3 $\beta$ /ELC,
- 20 I-309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2, MDC, DC-CK1/PARC, SLCなどのCCケモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポ
- 25



リペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸 (L P A)、スフィンゴシン 1-リン酸などが好適である。

- 具体的には、本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行うには、まず本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4~10 (望ましくは pH 6~8) のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプタータンパク質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup> (花王-アトラス社) 、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種タンパク質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的で PMSF、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10ml の該レセプター溶液に、一定量 (5000cpm~50000cpm) の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S] などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約 0℃~50℃、望ましくは約 4℃~37℃で、約 20分~24時間、望ましくは約 30分~3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量 (B) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント (B-NSB) が 0cpm を越える試験化合物を本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンド (アゴニスト) として選択することができる。

- 25 本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の④~⑤の方法を実施するためには、該レセプタータンパク質を介する細胞刺激

細胞内cAMP生成、細胞内Ca<sup>2+</sup>生成、細胞内pH変化、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを

- 促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプタータンパク質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

- 本発明のレセプタータンパク質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプタータンパク質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞、または本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

- Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②Gタンパク質共役型レセプタータンパク質標品

- 本発明のレセプタータンパク質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5  $\times$  10<sup>5</sup>個／穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

③標識試験化合物

市販の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、使用時に測定用緩衝液にて1 μMに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

#### ④非標識試験化合物

- 5 標識化合物と同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

#### 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプタータンパク質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

- 10 ②標識試験化合物を5 μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5 μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

- 15 ④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

本発明のレセプタータンパク質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、大腸、脾臓、膵臓、卵巣、精巣などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP27、PACAP38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ・インテスティナル・アンド・リレイテッド・ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエ

25 Oβ, GROγ, NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF4, IP-10

、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、HCC-1、MIP-3 $\alpha$ /LARC、MIP-3 $\beta$ /ELC、I-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCケモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン1-リン酸などが用いられる。

（2）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤

上記（1）の方法において、本発明のレセプタータンパク質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、①本発明のレセプタータンパク質または②該レセプタータンパク質をコードするDNAを、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のレセプタータンパク質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない（該レセプタータンパク質の欠乏症）患者がいる場合に、①本発明のレセプタータンパク質を該患者に投与し該レセプタータンパク質の量を補充したり、②（イ）本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）対象となる細胞に本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるレセプタータンパク質の量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。すなわち、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として有用である。

本発明のレセプタータンパク質のうち、TGR18-3は、Gタンパク質共役

型レセプタータンパク質であるK I A A 0 7 5 8 [DNA Res., 5 (5), 277-286 (1998)] にアミノ酸配列レベルで、約34%程度の相同性が認められる新規7回膜貫通型レセプタータンパク質である。

また、本発明のレセプタータンパク質のうち、T G R 1 8 - 3 は、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質であるH P 1 0 6 7 8 (WO 0 1 / 0 2 5 6 3) にアミノ酸配列レベルで、約78%程度の相同性が認められる新規7回膜貫通型レセプタータンパク質である。

本発明のレセプタータンパク質または該レセプタータンパク質をコードするDNAは中枢疾患(例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など)、炎症性疾患(例えば、アレルギー、喘息、リュウマチなど)、循環器疾患(例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等)、癌(例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等)、糖尿病などの予防および/または治療に有用である。

本発明のレセプタータンパク質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、①本発明のレセプタータンパク質または②該レセプタータンパク質をコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口

製剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤

実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。  
これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるように  
するものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラ  
チン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セル  
5 ロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨  
化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリ  
ンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤な  
どが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料に  
10 さらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物  
は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産  
出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方するこ  
とができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他  
の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナ  
15 トリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、  
エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリ  
コール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）  
などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いら  
れ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用しても  
20 よい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸  
ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイ  
ンなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど  
）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤など  
25 と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（  
例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル  
など）に対して投与することができる。

本発明のレセプタータンパク質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与

方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによつても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

- 10 本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによつても異なるが、
- 15 例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

### （3）遺伝子診断剤

- 20 本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまた
- 25 はmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブ

National Academy of Sciences of the USA) , 第86巻, 2766~2770  
頁(1989年)) などにより実施することができる。

(4) 本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化  
させる化合物のスクリーニング方法

- 5 本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

- すなわち、本発明は、例えば、(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞、または(ii) 形質転換体等に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNA量を測定することによる、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。
- 10

本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行う。

- 15 (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど) に対して、薬剤(例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など) あるいは物理的ストレス(例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など) などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、脳、肝臓、脾臓、大腸、膵臓、卵
- 20 巣、精巣など)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。

- 得られた細胞に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、TaqMan PCRなどの手法を用いることにより定量することができ、公知の手段によりノザンブロットを行うことにより解析することもできる。
- 25

(ii) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNAを同様にして定量、解析することができる。



本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的  
ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前  
5 ～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30  
分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時  
間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与  
後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ま  
しくは1時間後～24時間後）、細胞に含まれる本発明のレセプタータンパク質  
10 またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行うことがで  
き、

(i i) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（１日後～７日後、好ましくは１日後～３日後、より好ましくは２日後～３日後）、該形質転換体に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行うことができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を増加させることにより、Gタンパク質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、（ロ）本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

- 5      本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプタータンパク質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。
- 10      このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、
- 15      より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。
- 20      。

    （5）本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

- 25      本発明のレセプタータンパク質は上記のとおり、例えば、中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシ  
5 ル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の  
薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経  
口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味  
剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた  
10 製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。  
これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるよ  
うにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラ  
チン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セル  
ロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨  
15 化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリ  
ンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤な  
どが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料に  
さらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物  
20 は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産  
出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方するこ  
とができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他  
の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナ  
トリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、  
25 エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリ  
コール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）  
などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いら

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸

ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

- 5      このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

- 10      該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌症患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、  
15      より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(6) 本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドの定量法

- 20      本発明のレセプタータンパク質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

- 本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のレセプタータンパク質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、  
25      以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

(7) 本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質とリガンドとの結合

性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法

- 本発明のレセプタータンパク質等を用いるか、または組換え型レセプタータンパク質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

- このような化合物には、（イ）Gタンパク質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明のレセプタータンパク質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプタータンパク質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を減少させる化合物などが含まれる（なお、上記（イ）の化合物は、上記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい）。

- すなわち、本発明は、（i）本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドとを接触させた場合と（ii）本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行うことを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

例えば、試験化合物と本発明のタンパク質等に対する結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

①標識したリガンドを、本発明のレセプタータンパク質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプタータンパク質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプタータンパク質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンドを、本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプタータンパク質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプタータンパク質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプタータンパク質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

④本発明のレセプタータンパク質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプタータンパク質等に対するリガンドなど）を本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプタータンパク質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニ

ング方法、および

- ⑤本発明のレセプタータンパク質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプタータンパク質等に対するリガンドなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプタータンパク質等に接触させた場合と、本発明のレセプタータンパク質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプタータンパク質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 本発明のレセプタータンパク質等が得られる以前は、Gタンパク質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後該候補化合物が実際にヒトのGタンパク質共役型レセプタータンパク質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプタータンパク質も混在するために、目的とするレセプタータンパク質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。

- しかしながら、例えば、本発明のヒト由来レセプタータンパク質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴ

ニストか、アンタゴニストか、の区別は、本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下に示す。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプタータンパク質等

としては、上記した本発明のレセプタータンパク質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のレセプタータンパク質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプタータンパク質等などが適している。

本発明のレセプタータンパク質等を製造するには、上記の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことが好ましい。目的とするタンパク質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプタータンパク質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査は公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプタータンパク質等を含有するものとしては、公知の方法に従って精製したレセプタータンパク質等であってもよいし、該レセプタータンパク質等を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプタータンパク質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行うことができる。

本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞としては、該レセプタータンパク質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、



酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプタータンパク質等と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプタータンパク質等を含有する細胞や膜画分中のレセプタータンパク質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の①～③を実施するためには、例えば、適当なレセプタータンパク質画分と、標識したリガンドが必要である。

レセプタータンパク質画分としては、天然型のレセプタータンパク質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプタータンパク質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

25 標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標

具体的には、本発明のレセプタータンパク質等と、結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まず本発明のレセプタータンパク質等

を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプタータンパク質標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくはpH 6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプタータンパク質との結合を阻害しないバッファーであ  
5 ればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。  
10 る。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～50000cpm）の標識したリガンドを添加し、同時に $10^{-4}$ M～ $10^{-10}$ Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から  
15 3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ $B_0$ ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0$ -NSB）を100%とした時、特異的結合量（ $B$ -NSB）が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮  
20 抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする上記の④～⑤の方法を実施するためには、例えば、レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシ  
25 トールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮

な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行うには、適当なレセプタータンパク質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプタータンパク質等を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプタータンパク質等を有する細胞株、上記の組換え型レセプタータンパク質等を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプタータンパク質等、本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞、または本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. スクリーニング用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用

いる。

②細胞培養用培養液共役型レセプタータンパク質

本発明のレセプタータンパク質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに

5 × 10<sup>5</sup>個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

### ③標識リガンド

市販の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識したリガンド

- 5 水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。

### ④リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

## 10 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプタータンパク質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

- 15 ②10<sup>-3</sup>~10<sup>-10</sup>Mの試験化合物溶液を5μl加えた後、標識リガンドを5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに10<sup>-3</sup>Mのリガンドを5μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

- 20 ④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding(PMB)を次の式で求める。

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB: Percent Maximum Binding

B: 検体を加えた時の値

- 25 NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

B<sub>0</sub>: 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)Gタンパク質共役

- 型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する
- 5 化合物（いわゆる、本発明のレセプタータンパク質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプタータンパク質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を減少させる化合物で
- 10 ある。

該化合物としては、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 本発明のレセプタータンパク質等に対するアゴニストは、本発明のレセプター
- 15 タンパク質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のレセプタータンパク質等に対するアンタゴニストは、本発明のレセプタータンパク質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

- 20 リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を増強する化合物は、本発明のレセプタータンパク質等に対するリガンドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

- リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を減少させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等に対するリガンドが有する
- 25 生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物は、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤とする医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤

、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 5      該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60 kg として）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、
- 10      例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60 kg として）においては、一日につき約0.01～30 mg 程度、好ましくは約0.1～20 mg 程度、より好ましくは約0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

- （8）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質とリガンドとの結合性を变化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤
- 15

- 本発明のレセプタータンパク質は上記のとおり、例えば中枢機能、循環機能、消化機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明のレセプタータンパク質とリガンドとの結合性を变化させる化合物（ア
- 20      ゴニスト、アンタゴニスト）や本発明のレセプタータンパク質に対するリガンドは、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

- 該化合物やリガンドを本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化
- 25      することができる。

例えば、該化合物やリガンドは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の

担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

5 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤など  
10 が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他  
15 の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用しても  
20 よい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

製剤として使用することもできる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

（9）本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量

15 本発明の抗体は、本発明のレセプタータンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のレセプタータンパク質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、

20 （i）本発明の抗体と、被検液および標識化レセプタータンパク質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化レセプタータンパク質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプタータンパク質等の定量法、

25 （ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプタータンパク質等の定量法を提供する。

上記（ii）においては、一方の抗体が本発明のレセプタータンパク質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプタータンパク質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

本発明のレセプタータンパク質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明



のモノクローナル抗体と称する場合がある)を用いて本発明のレセプタータンパク質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行うこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。本発明のレセプタータンパク質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量(例えば、レセプタータンパク質量)に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、い

5 ずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後に記載するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

10

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例え

15

ば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

20

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

25

本発明の測定法は、例えば、被検液に標識剤と抗体を反応させ、抗体を固定させ(2次反応)た後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液

中の本発明のレセプタータンパク質を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。

- 5      また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

- 本発明のサンドイッチ法によるレセプタータンパク質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はレセプタータン
- 10      パク質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、レセプタータンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

- 本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、
- 15      競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリ
- 20      コール、上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

- イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗
- 25      原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈

降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプタータンパク質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in ENZYMOLOGY)」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行) など参照]。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のレセプタータンパク質またはその塩を感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のレセプタータンパク質またはその塩を定量することによって、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する各種疾患の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のレセプタータンパク質等の特異的に検出するために使用することができる。また、本発

明の抗体は、本発明のレセプタータンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

(10) 細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の抗体は、本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を特異的に認識することができるので、細胞膜における本発明のレセ  
5 プタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明の  
10 レセプタータンパク質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(i i) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明  
15 のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(i i i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での  
20 該レセプタータンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

(i v) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する  
25 形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該レセプタータンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの定量は具体的には以下のようにして行う。

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット
- 5   、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、脾臓、大腸、膵臓、卵巣、精巣など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた
- 10   臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤（例えば、トリトンX-100<sup>TM</sup>、ツイーン20<sup>TM</sup>など）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。
- 15   細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分
- 20   画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプタータンパク質等と細胞由来のリン脂質
- 25   や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチド

・解析法として、定量可能な抗体を用いる

かかるサンドイッチ免疫測定法は上記の方法と同様にして行うことができ、ウ

エスタンプロットは公知の手段により行うことができる。

(i i) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドを定量することができる。

- 5 細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングは、

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行うことができ、

- 15 (i i) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後）、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行うことができる。

- 20 細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの確認は具体的には以下のようにして行う。

- (i i i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、脾臓、大腸、膵臓、卵巣、精巣など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での該レセプタータンパク質の染色度合いを定量化

することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を確認することができる。

- (i v) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) 細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を増加させることにより、Gタンパク質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、(ロ) 細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプタータンパク質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセ

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（

例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

（11）細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明のレセプタータンパク質は上記のとおり、例えば、中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。





- その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。
- 5 5. 他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

（12）本発明のレセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体による中和

- 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の、それらレセプタータンパク質などに対する中和活性とは、すなわち、
- 10 10. 該レセプタータンパク質の関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、該レセプタータンパク質の関与するシグナル伝達、例えば、該レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動
- 15 15. 、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化することができる。したがって、該レセプタータンパク質の過剰発現などに起因する疾患の予防および／または治療に用いることができる。

- （13）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNA
- 20 20. Aを有する動物の作出

- 本発明のDNAを用いて、本発明のレセプタータンパク質等を発現するトランスジェニック動物を作出することができる。動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する場合がある）が挙げれるが、特に、マウス、ウサギなどが
- 25 25. 好適である。

本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相溶性が高い動物由来の本発明のDNAを動物細胞で発現させうる各種

プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のレセプタータンパク質等を高産生するDNA転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するNGF遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

受精卵細胞段階における本発明のDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のレセプタータンパク質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプタータンパク質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプタータンパク質等を有する。

本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明のDNAが転移された動物は、本発明のレセプタータンパク質等が高発現させられているので、本発明のレセプタータンパク質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のレセプタータンパク質が存在する組織を分析することにより、本発明のレセプタータンパク質等について分析することができる。本発明のレセプタータンパク質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由

細胞を用いて、本発明のレセプタータンパク質は、各種組織の機能を高めるような医薬品の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のレセプ

タンパク質等を単離精製することも可能である。

(14) アンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を含有する医薬

本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）に相補的に結合し、該ポリヌクレオチド（例、DNA）の発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のレセプタータンパク質または本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の機能を抑制することができるので、例えば、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合  
10 は、該アンチセンスポリヌクレオチドを、上記した本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAの場合と同様にして製剤化することができる。

このようにして得られる製剤は低毒性であり、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。

15 なお、該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進用の補助剤などの生理学的に認められる担体とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することもできる。

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより異なるが、例えば、癌の治療の目的で本発明のアンチセンスヌクレオチドを臓器（例、肝臓、肺、心臓、腎臓など）に局所投与する場合、成人（体重 60 kg）に対して、一日あたり約 0.1～100 mg である。

さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

25 本発明は、さらに

①本発明のレセプタータンパク質をコードするRNAの一部とそれに相補的なRNAとを含有する二重鎖RNA、

②前記二重鎖RNAを含有してなる医薬、

③本発明のレセプタータンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイ

ム、

④前記リボザイムを含有してなる医薬を提供する。

これらの二重鎖RNA (RNAi ; RNA interference 法)、リボザイムなどは、  
上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のポリヌクレオチド (例、  
5 DNA) の発現を抑制することができ、生体内における本発明のレセプタータン  
パク質または本発明のポリヌクレオチド (例、DNA) の機能を抑制することが  
できるので、例えば、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患  
の予防および／または治療剤として用いることができる。

二重鎖RNAは、公知の方法 (例、Nature, 411 巻, 494 頁, 2001 年) に準じ  
10 て、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法 (例、TRENDS in Molecular Medicine, 7 巻, 221  
頁, 2001 年) に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造  
することができる。例えば、本発明のレセプタータンパク質をコードするRNA  
の一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発  
15 明のレセプタータンパク質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイ  
ムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分 (RNA断  
片) が挙げられる。

上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、  
アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

20

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IU  
PAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分  
野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関  
し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

25

DNA : デオキシリボ核酸

T : チミン

	G	: グアニン
	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
5	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
10	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
15	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
20	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン
	Arg	: アルギニン
25	His	: ヒスチジン
	Phe	: フェニルアラニン
	Tyr	: チロシン
	Trp	: トリプトファン
	Pro	: プロリン

	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	*	: 終止コドンに対応する
5	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

10

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	T o s	: p-トルエンスルフォニル
15	C H O	: ホルミル
	B z l	: ベンジル
	C l <sub>2</sub> B z l	: 2, 6-ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
20	C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	D N P	: ジニトロフェノール
	T r t	: トリチル
25	B u m	: t-ブトキシメチル
	F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル

1, 2, 3-ヘンゾトリアジン

HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド  
DCC : N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

5

配列番号 : 1

本発明のヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR18-2のアミノ酸配列を示す。

配列番号 : 2

10 本発明のヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR18-2をコードするcDNAの塩基配列を示す。

配列番号 : 3

以下の実施例1、3、4および5におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す。

15 配列番号 : 4

以下の実施例1、2および3におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す。

配列番号 : 5

20 本発明のヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR18-3のアミノ酸配列を示す。

配列番号 : 6

本発明のヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR18-3をコードするcDNAの塩基配列を示す。

配列番号 : 7

25 以下の実施例2、4および5におけるPCR反応で使用したプライマー3の塩基配列を示す。

配列番号 : 8

以下の実施例5で使用したフォワードプライマーTGR18TQFの塩基配列を示す。



配列番号：9

以下の実施例5で使用したリバースプライマーTGR18TQRの塩基配列を示す。

配列番号：10

- 5 以下の実施例5で使用したプローブTGR18TQPの塩基配列を示す。

配列番号：11

本発明のヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR18-1のアミノ酸配列を示す。

配列番号：12

- 10 本発明のヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR18-1をコードするcDNAの塩基配列を示す。

以下の実施例3で得られた形質転換体、大腸菌 (*Escherichia coli*) TOP10/pCR2.1-TGR18-2は、2001年(平成13年)4月19日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERMBP-7550として、2001年(平成13年)4月11日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16610として寄託されている。

- 20 以下の実施例4で得られた形質転換体、大腸菌 (*Escherichia coli*) TOP10/pCR2.1-TGR18-3は、2001年(平成13年)4月19日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERMBP-7551として、2001年(平成13年)4月11日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵
- 25

#### 実施例

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範

囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

実施例1 ヒト精巣由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする

5 cDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト精巣cDNA (CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1 (配列番号: 3) およびプライマー2 (配列番号: 4) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAを3  $\mu$ l 鋳型として使用し、Advantage-GC2 Polymerase Mix (CLONTECH社) 1  $\mu$ l 量、プライマー1 (配列番号: 3) およびプライマー2 (配列番号: 4) を各0.5  $\mu$ M、dNTPsを200  $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを10  $\mu$ l、GC Meltを5  $\mu$ l 加え、50  $\mu$ l の液量とした。PCR反応は、95 $^{\circ}$ C・1分の後、95 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを5回、95 $^{\circ}$ C・30秒、66 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを5回、95 $^{\circ}$ C・30秒、64 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを30回繰り返し最後に68 $^{\circ}$ C・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物をTOPO-TAクローニングキット (Invitrogen社) の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1 (Invitrogen社) へサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNA配列 (配列番号: 12) を得た。このアミノ酸配列を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をTGR18-1と命名した。

TGR18-1の疎水性プロット図を図1に示す。

25 実施例2 ヒト精巣由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト精巣cDNA (CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー3 (配列番号: 7) およびプライマー2 (配列番号: 4) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAを3  $\mu$ l 鋳型として使用し

、 Advantage-GC2 Polymerase Mix (CLONTECH社) 1  $\mu$  l 量、プライマー 3 (配  
列番号: 7) およびプライマー 2 (配列番号: 4) を各 0.5  $\mu$  M、dNTPs  
を 200  $\mu$  M、および酵素に添付のバッファーを 10  $\mu$  l、GC Melt を 5  $\mu$  l 加  
え、50  $\mu$  l の液量とした。PCR 反応は、95℃・1 分の後、95℃・30 秒  
、68℃・2 分のサイクルを 5 回、95℃・30 秒、66℃・30 秒、68℃・  
2 分のサイクルを 5 回、95℃・30 秒、64℃・30 秒、68℃・2 分のサイ  
クルを 30 回繰り返し最後に 68℃・7 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産  
物を TOPO-TA クローニングキット (Invitrogen 社) の処方に従いプラスミ  
ドベクター pCR2.1 (Invitrogen 社) へサブクローニングした。これを大腸  
菌 TOP10 に導入し、cDNA を持つクローンをアンピシリンを含む LB 寒天  
培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規 G タンパク質共  
役型レセプタータンパク質をコードする cDNA 配列 (配列番号: 2) を得た。

実施例3 ヒト胎盤由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする  
15 cDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト胎盤 cDNA (CLONTECH社) を鋳型とし、2 個のプライマー、プライマー 1 (配列番号: 3) およびプライマー 2 (配列番号: 4) を用いて PCR 反応を行った。該反応における反応液の組成は上記 cDNA を  $3 \mu\text{l}$  鋳型として使用し、Advantage-GC2 Polymerase Mix (CLONTECH社)  $1 \mu\text{l}$  量、プライマー 1 (配列番号: 3) およびプライマー 2 (配列番号: 4) を各  $0.5 \mu\text{M}$ 、dNTPs を  $200 \mu\text{M}$ 、および酵素に添付のバッファーを  $10 \mu\text{l}$ 、GC Melt を  $5 \mu\text{l}$  加え、 $50 \mu\text{l}$  の液量とした。PCR 反応は、 $95^\circ\text{C} \cdot 1$  分の後、 $95^\circ\text{C} \cdot 30$  秒、 $68^\circ\text{C} \cdot 2$  分のサイクルを 5 回、 $95^\circ\text{C} \cdot 30$  秒、 $66^\circ\text{C} \cdot 30$  秒、 $68^\circ\text{C} \cdot 2$  分のサイクルを 5 回、 $95^\circ\text{C} \cdot 30$  秒、 $64^\circ\text{C} \cdot 30$  秒、 $68^\circ\text{C} \cdot 2$  分のサイクルを 30 回繰り返し最後に  $68^\circ\text{C} \cdot 7$  分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産物を TOP-O-TA クローニングキット (Invitrogen社) の処方に従いプラスミ

培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共

役型レセプタータンパク質をコードするcDNA配列（配列番号：2）を得た。これらのアミノ酸配列を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をTGR18-2と命名した。また形質転換体が大腸菌（*Escherichia coli*）TOP10/pCR2.1-TGR18-2と命名した。

- 5 TGR18-2の疎水性プロット図を図2に示す。

#### 実施例4 ヒト胎盤由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

- ヒト胎盤cDNA（CLONTECH社）を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー
- 10 1（配列番号：3）およびプライマー3（配列番号：7）を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAを3 $\mu$ l鋳型として使用し、Advantage-GC2 Polymerase Mix（CLONTECH社）1 $\mu$ l量、プライマー1（配列番号：3）およびプライマー3（配列番号：7）を各0.5 $\mu$ M、dNTPsを200 $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを10 $\mu$ l、GC Meltを5 $\mu$ l加
- 15 え、50 $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、95 $^{\circ}$ C・1分の後、95 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを5回、95 $^{\circ}$ C・30秒、66 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを5回、95 $^{\circ}$ C・30秒、64 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを30回繰り返し最後に68 $^{\circ}$ C・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物をTOPO-TAクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNA配列（配列番号：6）を得た。これらのアミノ酸配列を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質
- 25 をTGR18-3と命名した。また形質転換体が大腸菌（*Escherichia coli*）TOP10/pCR2.1-TGR18-3と命名した。

TGR18-3の疎水性プロット図を図3に示す。

#### 実施例5 TaqMan PCRを用いたTGR18の発現組織分布の解析

まずプライマー及びプローブはPrimer Express ver. 1.0 (PEバイオシステムズジャパン) を用いてデザインし、フォワードプライマーTGR18TQF (5' -GGCAA GAGCT AAGGA AGCTG TG- 3' (配列番号: 8))、リバープライマーTGR18TQR (5' -CACCA GACCA TTTAC CTGTC TGG- 3' (配列番号: 9))、  
5 プローブTGR18TQP (5' -CTATC CTGAG AGAAG CCCAC TTGCA AAATG- 3' (配列番号: 10)) を作製した。プローブのリポーター色素はFAM (6-carboxyfluorescein) を付加した。

スタンダードcDNAは、pCR2.1-TGR18-3を鋳型にしてプライマー1 (配列番号: 3) およびプライマー3 (配列番号: 7) を用いて増幅した  
10 PCR断片をQIAquick PCR Purification Kit [QIAGEN (Germany)] にて精製し、 $10^0 - 10^6$ コピー/5  $\mu$ l に調製して用いた。

各組織のcDNAソースはCLONTECH社SMART RACE Library Systemを用いて作製した各種cDNAライブラリーを用いた。TGR18 (TGR18-1、TGR18-2およびTGR18-3の合計) 発現量と同時に、TaqMan  $\beta$ -actin control reagents Mix (PEバイオシステムズジャパン) を用いて $\beta$ -actin発現量を測定してnormalizeすることにより、TGR18 (TGR18-1、TGR18-2およびTGR18-3の合計) 組織分布を比較した。  
15

TaqMan PCRは、TaqMan Universal PCR Master Mix (PEバイオシステムズジャパン) の試薬を用い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PEバイオシステムズジャパン) にて、添付の説明書に従い反応させた。  
20

結果を図7および表1に示した。TGR18は胎盤で高い発現が、また精巣でわずかな発現が見られた。

表 1

	組織	発現量
		(コピー数/ $\beta$ -actin $\times 10000$ )
5	脳	1
	胎児脳	0
	脾臓	1
	肝臓	0
	心臓	1
	腎臓	0
	精巣	7
10	肺	1
	胸腺	0
	胎盤	374
	白血球	0
	膵臓	0
	下垂体	3

15

## 産業上の利用可能性

本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチド  
 またはその塩、該レセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするポ  
 リヌクレオチド（例えば、DNA、RNAおよびそれらの誘導体）は、①リガン  
 ド（アゴニスト）の決定、②抗体および抗血清の入手、③組換え型レセプタータ  
 ンパク質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発  
 と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプタ  
 ーとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプロー  
 ブやPCRプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作出ま  
 たは⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。

## 請求の範囲

1. 配列番号：1、配列番号：5または配列番号：11で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩。
- 5 2. 配列番号：1、配列番号：5または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩。
3. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
- 10 4. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
5. DNAである請求項4記載のポリヌクレオチド。
6. 配列番号：2、配列番号：6または配列番号：12で表される塩基配列を有する請求項4記載のポリヌクレオチド。
- 15 7. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
8. 請求項7記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
9. 請求項8記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を生成せしめることを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩の製造法。
- 20 10. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。
11. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
12. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
- 25 13. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である請求項12記載の抗体。

請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を含有してなる医薬、請求項12記載の抗体、請求項13記載の中和抗体、請求項14記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を用いることにより得られうる請求項1記載

のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンド。

16. 請求項15記載のGタンパク質共役型レセプターのリガンドを含有してなる医薬。

17. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項5  
3記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載のG  
タンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方  
法。

18. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項  
3記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項  
10 1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を  
変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

19. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項  
3記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求  
項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を  
15 変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

20. 請求項18記載のスクリーニング方法または請求項19記載のスクリーニ  
ング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型  
レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩  
。

21. 請求項18記載のスクリーニング方法または請求項19記載のスクリーニ  
ング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型  
レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩  
を含有してなる医薬。

22. 請求項4記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイ  
ブリダイズするポリヌクレオチド。  
25

23. 請求項4記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を  
含有してなるポリヌクレオチド。

24. 請求項4記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とす  
る請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のmRNAの定量方



法。

25. 請求項12記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の定量方法。

26. 請求項24または請求項25記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型レセプターの機能が関連する疾患の診断方法。

27. 請求項24記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

28. 請求項25記載の定量方法を用いることを特徴とする細胞膜における請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

29. 請求項27記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩。

30. 請求項28記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化合物またはその塩。

31. 請求項27記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

32. 請求項28記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

33. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または請求項3記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする請求項17記載のリガンドの決定方法。

の塩または請求項3記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させた場合と、(i i) 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク

質もしくはその塩または請求項3記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行うことを特徴とする請求項18記載のスクリーニング方法。

35. (i) 標識したリガンドを請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または請求項3記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または請求項3記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または請求項3記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

36. (i) 標識したリガンドを請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

37. (i) 標識したリガンドを請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

38. (i) 標識したリガンドを請求項8記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したGタンパク質共役型レセプタータンパク質

に接触させた場合と、(i i) 標識したリガンドおよび試験化合物を請求項 8 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した G タンパク質共役型レセプタータンパク質に接触させた場合における、標識したリガンドの該 G タンパク質共役型レセプタータンパク質に対する結合量を測定し、比較

5 することを特徴とするリガンドと請求項 1 記載の G タンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

39. (i) 請求項 1 記載の G タンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物を請求項 1 記載の G タンパク質共役型レセプタータン

10 パク質を含有する細胞に接触させた場合と、(i i) 請求項 1 記載の G タンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を請求項 1 記載の G タンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接

15 触させた場合における、G タンパク質共役型レセプタータンパク質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと請求項 1 記載の G タン

15 パク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

40. 請求項 1 記載の G タンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物を請求項 8 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した G タンパク質共役型レセプタータン

20 場合と、請求項 1 記載の G タンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を請求項 8 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した G タンパク質共役型レセプタータン

25 パク質に接触させた場合における、G タンパク質共役型レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと請求項 1 記載の G タンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

ルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチド Y、オピオイド、プリン

- 、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸またはスフィンゴシン1-リン酸である請求項39または請求項40記載のスクリーニング方法。
- 10 42. 請求項34～請求項41のいずれかに記載のスクリーニング方法で得られうるリガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。
43. 請求項34～請求項41のいずれかに記載のスクリーニング方法で得られうるリガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする
- 15 医薬。
44. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞を含有することを特徴とする請求項19記載のスクリーニング用キット。
45. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞
- 20 の膜画分を含有することを特徴とする請求項19記載のスクリーニング用キット。
46. 請求項8記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有することを特徴とする請求項19記載のスクリーニング用キット。
- 25 47. 請求項44～請求項46のいずれかに記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。
48. 請求項44～請求項46のいずれかに記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータン

パク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬。

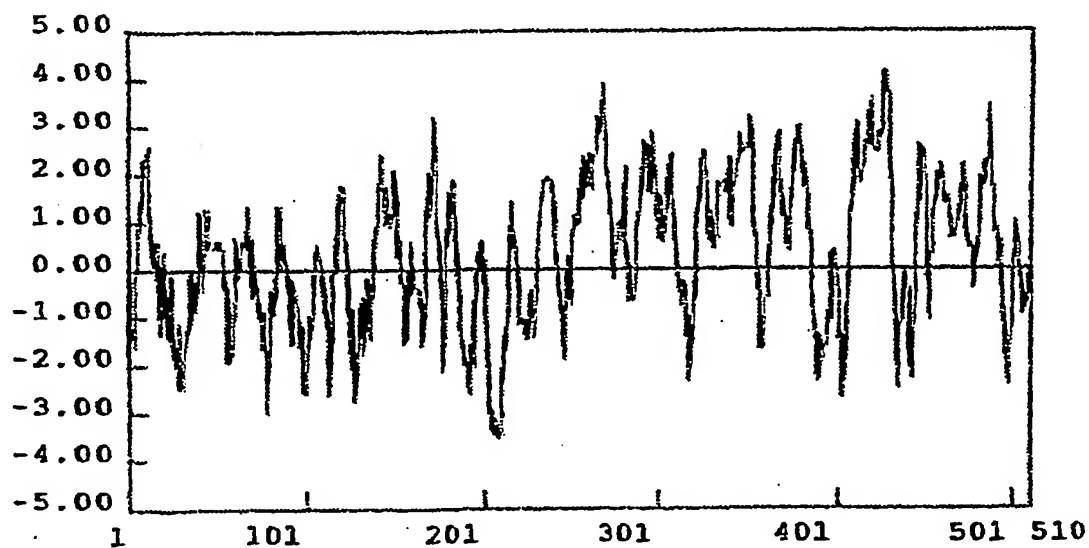
49. 請求項12記載の抗体と、請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする請求項1のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法。

50. 請求項12記載の抗体と、被検液および標識化された請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法。

51. 被検液と担体上に不溶化した請求項12記載の抗体および標識化された請求項12記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法。

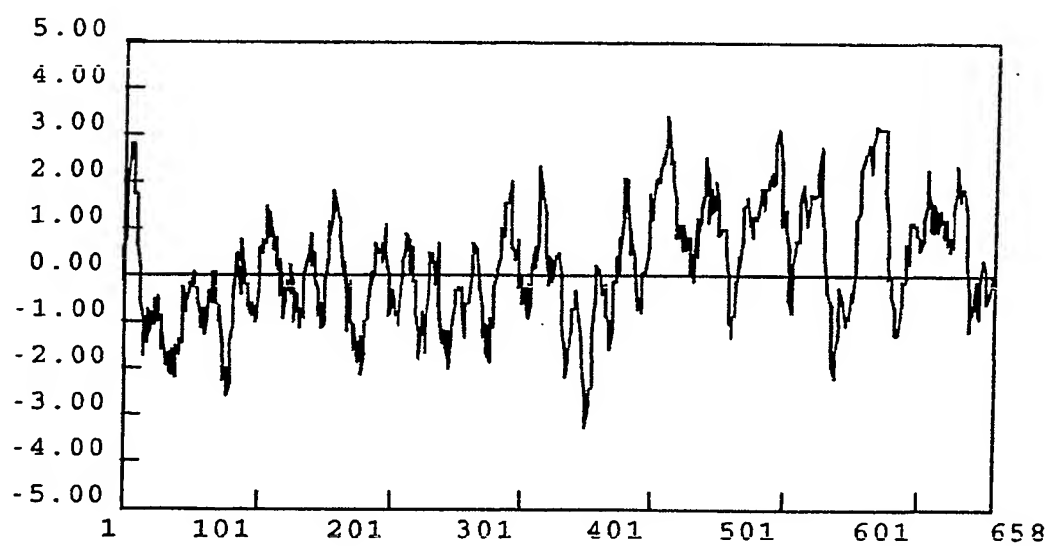
1/7

図 1



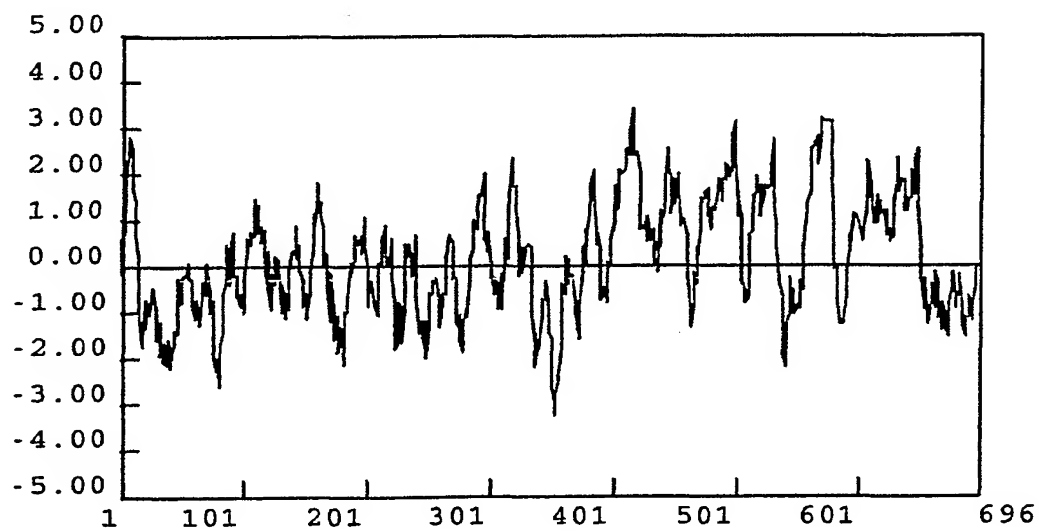
2 / 7

図 2



3 / 7

図 3





4 / 7

☒ 4

MVKSETTSGNIAFIVELLKNISTDLSDNVTREKMKSYSEVANHILDTAAISNWAFIPKNASSDLLQSVNL  
FARQLHIHNSENIVNELFIQTKGFHINHNTSEKSLNFSMSMNNTTEDILGMVQIPRQELRKLWPNASQAIS  
IAFPTLGAILREAHLQNVSLPRQVNGLVLSVVLPERLQEIILTFEKINKTRNARAQCVGWSKKRRWDEKAC  
QWGLDIRNEVKCRCNYTSVMSFSILMSSKSMTDKVLDYITCIGLSVSILSLVLCLIEATVWSRVVVTEIS  
YMRHVCIVNIAVSLLTANVWFIIGSHFNKAQDYNMCVAVTFFSHFFYLSLFFWMLFKALLIYIGILVIFRR  
MMKSRMMVIGFAIGYGCPILIAVTTVAITEPENGYMRPEACWLNWDNTKALLAFAIPAFVIVAVNLIVVLVV  
AVNTQRPSIGSSKSQDVVIMRISKNVAILTPLLGLTWGFGIATLIEGTSITFHIIFALLNAFQVSSKRETF  
LCYSD\*

5 / 7

☒ 5

MKMKSQATMICCLVFFLSTECSHYRSKIHLKAGDKLQSPEGKPKTGRIQEKCEG  
PCISSNCSQPCAKDFHGEIGFTCNQKKWQKSAETCTSLSVEKLFKDSTGASRLS  
VAAPSIPLHILDFRAPETIESVAQGIRKNCPFDYACITDMVKSETTSGNIAFIVELL  
KNISTDLSDNVTREKMKSYSSEVANHILDTAAISNWAFIPNKNASSDLLQSVNLFA  
RQLHIHNSENIVNELFIQTKGFHINHNTSEKSLNFSMSMNNTTEDILGMVQIPR  
QELRKLWPNASQAISIAFPTLGAILREHLQNVSLPRQVNGLVLSVVLPERLQEII  
LTFEKINKTRNARAQCVGWHSKKRRWDEKACQMMLDIRNEVKCRCNYTSVV  
MSFSILMSSKSMTDKVLDYITCIGLSVSILSLVLCLIEATVWSRVVVTEISYMRH  
VCIVNIAVSLLTANVWFIIGSHFNIKAQDYNMCVAVTFFSHFFYLSSLFFWMLFKA  
LLIYGILVIFRRMMKSRMMVIGFAIGYGCPLIIAVTTVAITEPENGYMRPEACWL  
NWDNTKALLAFAIPAFVIVAVNLIVVLVAVNTQRPSIGSSKSQDVVIIMRISKNV  
AILTPLLGLTWGFGIATLIEGTSLTFHIIIFALLNAFQVSSKRETFLCYSD\*

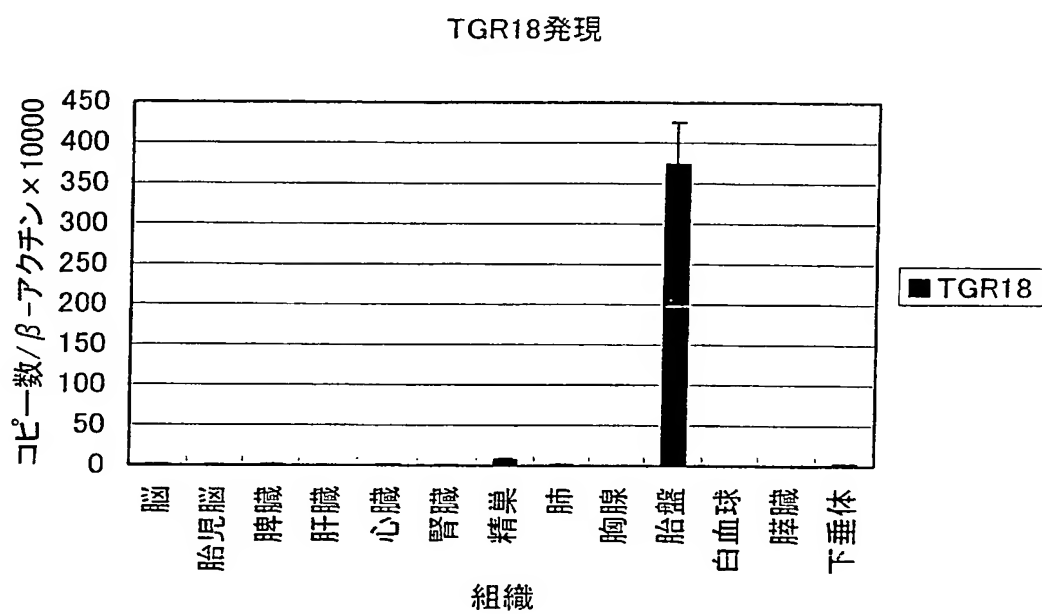
6 / 7

図 6

MKMKSQATMICCLVFFLSTECSHYRSKIHLKAGDKLQSPEGKPKTGRIQEKCEG  
PCISSNCSQPCAKDFHGEIGFTCNQKKWQKSAETCTSLSVEKLFKDSTGASRLS  
VAAPSIPLHILDFRAPETIESVAQGIRKNCPFDYACITDMVKSSETTSGNIAFIVEL  
LKNISTDLSDNVTREKMKSYSSEVANHILDTAAISNWFIPNKNASSDLLQSVNL  
FARQI.HIHNNSEFIVNELFIQTKGFHINHNTSEKSLNFSMSMNNTTEDILGMVQI  
PRQELRKLWPNASQAISIAFPTLGAILREAHLQNVSLPRQVNGLVLSVVLPERLQ  
EIILTFEKINKTRNARAQCVGWHSKKRRWDEKACQMMLDIRNEVKCRCNYTS  
VVMSFSILMSSKSMTDKVLDYITCIGLSVSILSLVLCLIEATVWSRVVVTEISYM  
RHVCIVNIAVSLLTANVWFIIGSHFNKAQDYNMCAVAVTFFSHFFYLSLFFWML  
FKALLIYGILVIFRRMMKSRMMVIGFAIGYGCPLIHAVTTVAITEPENG YMRPEA  
CWL NWDNTKALLAFAIPAFVIVAVNLIVVLVVA VNTQRPSIGSSKSQDVVIIMRI  
SKNVAILTPLLGLTWGFGIATLIEGTSLTFHIIFALLNAFQGFFILLFGTIMDHKIR  
DALRMRMSSLKGKSRAAENASLGPTNGSKLMNRQG\*

7/7

図 7



## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel G Protein-Coupled Receptor and its DNA

<130> P2001-192PCT

<150> JP 2000-280137

<151> 2000-09-11

<150> JP 2001-132920

<151> 2001-04-27

<160> 12

<210> 1

<211> 657

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met	Lys	Met	Lys	Ser	Gln	Ala	Thr	Met	Ile	Cys	Cys	Leu	Val	Phe	Phe
			5						10					15	
Leu	Ser	Thr	Glu	Cys	Ser	His	Tyr	Arg	Ser	Lys	Ile	His	Leu	Lys	Ala
			20					25					30		
Gly	Asp	Lys	Leu	Gln	Ser	Pro	Glu	Gly	Lys	Pro	Lys	Thr	Gly	Arg	Ile
		35					40					45			
Gln	Glu	Lys	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Ile	Ser	Ser	Ser	Asn	Cys	Ser	Gln
		50				55					60				
Pro	Cys	Ala	Lys	Asp	Phe	His	Gly	Glu	Ile	Gly	Phe	Thr	Cys	Asn	Gln
	65					70				75					80

Lys	Leu	Phe	Lys	Asp	Ser	Thr	Gly	Ala	Ser	Arg	Leu	Ser	Val	Ala	Ala
			100						105					110	

Pro	Ser	Ile	Pro	Leu	His	Ile	Leu	Asp	Phe	Arg	Ala	Pro	Glu	Thr	Ile
		115					120					125			
Glu	Ser	Val	Ala	Gln	Gly	Ile	Arg	Lys	Asn	Cys	Pro	Phe	Asp	Tyr	Ala
		130				135					140				
Cys	Ile	Thr	Asp	Met	Val	Lys	Ser	Ser	Glu	Thr	Thr	Ser	Gly	Asn	Ile
145					150				155					160	
Ala	Phe	Ile	Val	Glu	Leu	Leu	Lys	Asn	Ile	Ser	Thr	Asp	Leu	Ser	Asp
			165					170					175		
Asn	Val	Thr	Arg	Glu	Lys	Met	Lys	Ser	Tyr	Ser	Glu	Val	Ala	Asn	His
		180						185				190			
Ile	Leu	Asp	Thr	Ala	Ala	Ile	Ser	Asn	Trp	Ala	Phe	Ile	Pro	Asn	Lys
	195					200				205					
Asn	Ala	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Gln	Ser	Val	Asn	Leu	Phe	Ala	Arg	Gln
210					215					220					
Leu	His	Ile	His	Asn	Asn	Ser	Glu	Asn	Ile	Val	Asn	Glu	Leu	Phe	Ile
225				230				235					240		
Gln	Thr	Lys	Gly	Phe	His	Ile	Asn	His	Asn	Thr	Ser	Glu	Lys	Ser	Leu
			245					250				255			
Asn	Phe	Ser	Met	Ser	Met	Asn	Asn	Thr	Thr	Glu	Asp	Ile	Leu	Gly	Met
		260						265				270			
Val	Gln	Ile	Pro	Arg	Gln	Glu	Leu	Arg	Lys	Leu	Trp	Pro	Asn	Ala	Ser
	275					280						285			
Gln	Ala	Ile	Ser	Ile	Ala	Phe	Pro	Thr	Leu	Gly	Ala	Ile	Leu	Arg	Glu
290					295					300					
Ala	His	Leu	Gln	Asn	Val	Ser	Leu	Pro	Arg	Gln	Val	Asn	Gly	Leu	Val
305				310					315					320	
Leu	Ser	Val	Val	Leu	Pro	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Ile	Ile	Leu	Thr	Phe
			325					330				335			
Glu	Lys	Ile	Asn	Lys	Thr	Arg	Asn	Ala	Arg	Ala	Gln	Cys	Val	Gly	Trp
		340					345					350			
His	Ser	Lys	Lys	Arg	Arg	Trp	Asp	Glu	Lys	Ala	Cys	Gln	Met	Met	Leu
	355						360					365			
Asp	Ile	Arg	Asn	Glu	Val	Lys	Cys	Arg	Cys	Asn	Tyr	Thr	Ser	Val	Val
370				375						380					
Met	Ser	Phe	Ser	Ile	Leu	Met	Ser	Ser	Lys	Ser	Met	Thr	Asp	Lys	Val
385				390						395				400	

Leu Asp Tyr Ile Thr Cys Ile Gly Leu Ser Val Ser Ile Leu Ser Leu  
 405 410 415  
 Val Leu Cys Leu Ile Ile Glu Ala Thr Val Trp Ser Arg Val Val Val  
 420 425 430  
 Thr Glu Ile Ser Tyr Met Arg His Val Cys Ile Val Asn Ile Ala Val  
 435 440 445  
 Ser Leu Leu Thr Ala Asn Val Trp Phe Ile Ile Gly Ser His Phe Asn  
 450 455 460  
 Ile Lys Ala Gln Asp Tyr Asn Met Cys Val Ala Val Thr Phe Phe Ser  
 465 470 475 480  
 His Phe Phe Tyr Leu Ser Leu Phe Phe Trp Met Leu Phe Lys Ala Leu  
 485 490 495  
 Leu Ile Ile Tyr Gly Ile Leu Val Ile Phe Arg Arg Met Met Lys Ser  
 500 505 510  
 Arg Met Met Val Ile Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Gly Cys Pro Leu Ile  
 515 520 525  
 Ile Ala Val Thr Thr Val Ala Ile Thr Glu Pro Glu Asn Gly Tyr Met  
 530 535 540  
 Arg Pro Glu Ala Cys Trp Leu Asn Trp Asp Asn Thr Lys Ala Leu Leu  
 545 550 555 560  
 Ala Phe Ala Ile Pro Ala Phe Val Ile Val Ala Val Asn Leu Ile Val  
 565 570 575  
 Val Leu Val Val Ala Val Asn Thr Gln Arg Pro Ser Ile Gly Ser Ser  
 580 585 590  
 Lys Ser Gln Asp Val Val Ile Ile Met Arg Ile Ser Lys Asn Val Ala  
 595 600 605  
 Ile Leu Thr Pro Leu Leu Gly Leu Thr Trp Gly Phe Gly Ile Ala Thr  
 610 615 620  
 Leu Ile Glu Gly Thr Ser Leu Thr Phe His Ile Ile Phe Ala Leu Leu  
 625 630 635 640  
 Asn Ala Phe Gln Val Ser Ser Lys Arg Glu Thr Phe Leu Cys Tyr Ser  
 645 650 655

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1971

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

atgaaaatga agtcccaggc aacctatgatt tgctgcttag tgttctttct gtccacagaa 60  
tgttcccact atagatccaa gattcaccta aaagctggag ataaacttca aagccctgaa 120  
gggaaaccca agactggaag gatccaagag aaatgcgaag gaccttgtat ttctttcttc 180  
aactgcagcc agccctgtgc taaggacttt catggagaaa taggatttac atgtaatcaa 240  
aaaaagtggc aaaaatcagc tgaacatgt acaagccttt ctgtggaaaa actctttaag 300  
gactcaactg gtgcatctcg ctttctgtga gcagcaccat ctataacctt gcataattcta 360  
gactttcgag ctccagagac cattgagagt gtagctcaag gaatccgtaa gaactgcccc 420  
tttgattatg cctgcatcac tgacaiggtg aaatcatcag aaacaacatc tggaaatatt 480  
gcatttatag tggagttatt aaaaaatatt tctacagact tgtctgataa tgttactcga 540  
gagaaaatga agagctatag tgaagtggcc aaccacatcc tcgacacagc agccatttca 600  
aactgggctt tcatctccaa caaaaatgcc agctcggatt tgttgcagtc agtgaatttg 660  
tttgcagac aactccacat ccacaataat tctgagaaca ttgtgaatga actcttcatt 720  
cagacaaaag ggtttcacat caaccataat acctcagaga aaagcctcaa ttcttccatg 780  
agcatgaaca ataccacaga agatatctta ggaatggtac agattcccag gcaagagcta 840  
aggaagctgt ggccaaatgc atcccaagcc attagcatag ctttcccaac cttgggggct 900  
atcctgagag aagcccactt gcaaaatgtg agtcttccca gacaggtaaa tggctctggtg 960  
ctatcagtg ttttaccaga aaggttgcaa gaaatcatac tcaccttcga aaagatcaat 1020  
aaaacccgca atgccagagc ccagtgtgtt ggctggcact ccaagaaaag gagatgggat 1080  
gagaaagcgt gccaaatgat gttggatatac aggaacgaag tgaaatgccg ctgtaaactac 1140  
accagtgtgg tgatgtcttt ttccattctc atgtcctcca aatcgatgac cgacaaagtt 1200  
ctggactaca tcacctgcat tgggtcagc gtctcaatcc taagcttgggt tctttgcctg 1260  
atcattgaag ccacagtgtg gtcccgggtg gttgtgacgg agatatcata catgcgtcac 1320  
gtgtgcatcg tgaatatagc agtgtccctt ctgactgcca atgtgtggtt tatcataggc 1380  
tctcacttta acattaaggc ccaggactac aacatgtgtg ttgcagtac atttttcagc 1440  
cactttttct acctctctct gttttcttgg atgtcttcca aagcattgct catcatttat 1500  
ggaatattgg tcattttccg taggatgatg aagtcccga tgaatggcat tggctttgcc 1560  
attggctatg ggtgcccatt gatcattgct gtcactacag ttgctatcac agagccagag 1620  
aacggctaca tgagacctga ggctgttgg cttactggg acaataccaa agccctttta 1680  
gcatttgcca tcccggcggt cgtcattgtg gctgtaaatc tgattgtggt tttggttgtt 1740  
gctgtcaaca ctgagaggcc ctctattggc agttccaagt ctgaggatgt ggtcataatt 1800  
atgaggatca gcaaaaatgt tgccatctc actccactgc tgggactgac ctggggtttt 1860  
ggaatagcca ctctcataga aggcattcc ttgacgttcc atataatatt tgccttgctc 1920



aatgctttcc aggtaagttc caagagggag acttttctgt gttactccga c 1971

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR18-2

<400> 3

atgaaaatga agtcccaggc aacc 24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR18-2

<400> 4

ctagtcggag taacacagaa aagt 24

<210> 5

<211> 695

<212> PRT

<213> Human

<400> 5

Met Lys Met Lys Ser Gln Ala Thr Met Ile Cys Cys Leu Val Phe Phe  
5 10 15

Gly Asp Lys Leu Gln Ser Pro Glu Gly Lys Pro Lys Thr Gly Arg Ile  
35 40 45

Gln Glu Lys Cys Glu Gly Pro Cys Ile Ser Ser Ser Asn Cys Ser Gln  
 50 55 60  
 Pro Cys Ala Lys Asp Phe His Gly Glu Ile Gly Phe Thr Cys Asn Gln  
 65 70 75 80  
 Lys Lys Trp Gln Lys Ser Ala Glu Thr Cys Thr Ser Leu Ser Val Glu  
 85 90 95  
 Lys Leu Phe Lys Asp Ser Thr Gly Ala Ser Arg Leu Ser Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Ile Pro Leu His Ile Leu Asp Phe Arg Ala Pro Glu Thr Ile  
 115 120 125  
 Glu Ser Val Ala Gln Gly Ile Arg Lys Asn Cys Pro Phe Asp Tyr Ala  
 130 135 140  
 Cys Ile Thr Asp Met Val Lys Ser Ser Glu Thr Thr Ser Gly Asn Ile  
 145 150 155 160  
 Ala Phe Ile Val Glu Leu Leu Lys Asn Ile Ser Thr Asp Leu Ser Asp  
 165 170 175  
 Asn Val Thr Arg Glu Lys Met Lys Ser Tyr Ser Glu Val Ala Asn His  
 180 185 190  
 Ile Leu Asp Thr Ala Ala Ile Ser Asn Trp Ala Phe Ile Pro Asn Lys  
 195 200 205  
 Asn Ala Ser Ser Asp Leu Leu Gln Ser Val Asn Leu Phe Ala Arg Gln  
 210 215 220  
 Leu His Ile His Asn Asn Ser Glu Asn Ile Val Asn Glu Leu Phe Ile  
 225 230 235 240  
 Gln Thr Lys Gly Phe His Ile Asn His Asn Thr Ser Glu Lys Ser Leu  
 245 250 255  
 Asn Phe Ser Met Ser Met Asn Asn Thr Thr Glu Asp Ile Leu Gly Met  
 260 265 270  
 Val Gln Ile Pro Arg Gln Glu Leu Arg Lys Leu Trp Pro Asn Ala Ser  
 275 280 285  
 Gln Ala Ile Ser Ile Ala Phe Pro Thr Leu Gly Ala Ile Leu Arg Glu  
 290 295 300  
 Ala His Leu Gln Asn Val Ser Leu Pro Arg Gln Val Asn Gly Leu Val  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Val Val Leu Pro Glu Arg Leu Gln Glu Ile Ile Leu Thr Phe  
 325 330 335

Glu Lys Ile Asn Lys Thr Arg Asn Ala Arg Ala Gln Cys Val Gly Trp  
                   340                                  345                                  350  
 His Ser Lys Lys Arg Arg Trp Asp Glu Lys Ala Cys Gln Met Met Leu  
                   355                                  360                                  365  
 Asp Ile Arg Asn Glu Val Lys Cys Arg Cys Asn Tyr Thr Ser Val Val  
                   370                                  375                                  380  
 Met Ser Phe Ser Ile Leu Met Ser Ser Lys Ser Met Thr Asp Lys Val  
                   385                                  390                                  395                                  400  
 Leu Asp Tyr Ile Thr Cys Ile Gly Leu Ser Val Ser Ile Leu Ser Leu  
                                   405                                  410                                  415  
 Val Leu Cys Leu Ile Ile Glu Ala Thr Val Trp Ser Arg Val Val Val  
                                   420                                  425                                  430  
 Thr Glu Ile Ser Tyr Met Arg His Val Cys Ile Val Asn Ile Ala Val  
                                   435                                  440                                  445  
 Ser Leu Leu Thr Ala Asn Val Trp Phe Ile Ile Gly Ser His Phe Asn  
                                   450                                  455                                  460  
 Ile Lys Ala Gln Asp Tyr Asn Met Cys Val Ala Val Thr Phe Phe Ser  
                   465                                  470                                  475                                  480  
 His Phe Phe Tyr Leu Ser Leu Phe Phe Trp Met Leu Phe Lys Ala Leu  
                                   485                                  490                                  495  
 Leu Ile Ile Tyr Gly Ile Leu Val Ile Phe Arg Arg Met Met Lys Ser  
                                   500                                  505                                  510  
 Arg Met Met Val Ile Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Gly Cys Pro Leu Ile  
                                   515                                  520                                  525  
 Ile Ala Val Thr Thr Val Ala Ile Thr Glu Pro Glu Asn Gly Tyr Met  
                                   530                                  535                                  540  
 Arg Pro Glu Ala Cys Trp Leu Asn Trp Asp Asn Thr Lys Ala Leu Leu  
                   545                                  550                                  555                                  560  
 Ala Phe Ala Ile Pro Ala Phe Val Ile Val Ala Val Asn Leu Ile Val  
                                   565                                  570                                  575  
 Val Leu Val Val Ala Val Asn Thr Gln Arg Pro Ser Ile Gly Ser Ser  
                                   580                                  585                                  590  
  
 Ile Leu Thr Pro Leu Leu Gly Leu Thr Trp Gly Phe Gly Ile Ala Thr  
                   610                                  615                                  620

Leu Ile Glu Gly Thr Ser Leu Thr Phe His Ile Ile Phe Ala Leu Leu  
 625                                  630                                  635                                  640  
 Asn Ala Phe Gln Gly Phe Phe Ile Leu Leu Phe Gly Thr Ile Met Asp  
                                 645                                  650                                  655  
 His Lys Ile Arg Asp Ala Leu Arg Met Arg Met Ser Ser Leu Lys Gly  
                                 660                                  665                                  670  
 Lys Ser Arg Ala Ala Glu Asn Ala Ser Leu Gly Pro Thr Asn Gly Ser  
                                 675                                  680                                  685  
 Lys Leu Met Asn Arg Gln Gly  
                                 690                                  695

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 2085

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 6

```

atgaaaatga agtcccaggc aaccatgatt tgctgcttag tgttctttct gtccacagaa 60
tgttcccact atagatccaa gattcaccta aaagctggag ataaacttca aagccctgaa 120
gggaaaccca agactggaag gatccaagag aaatgcgaag gaccttgtat ttctttcttc 180
aactgcagcc agccctgtgc taaggacitt catggagaaa taggatttac atgtaatcaa 240
aaaaagtggc aaaaatcagc tgaaacatgt acaagccttt cigtggaaaa actctttaag 300
gactcaactg gtgcatctcg cctttctgta gcagcaccat ctatacctct gcataattcta 360
gactttcgag ctccagagac cattgagagt gtagctcaag gaatccgtaa gaactgcccc 420
tttgattatg cctgcatcac tgacatggig aaatcatcag aaacaacatc tggaaatatt 480
gcatttatag tggagttatt aaaaaatatt tctacagact tgtctgataa tgttactega 540
gagaaaatga agagctatag tgaagtggcc aaccacatcc tcgacacagc agccatttca 600
aactgggctt tcaattccaa caaaaatgcc agctcggatt tgttgcaatc agtgaatttg 660
tttgccagac aactccacat ccacaataat tctgagaaca ttgtgaatga actcttcatt 720
cagacaaaag ggtttcacat caaccataat acctcagaga aaagcctcaa tttctccatg 780
agcatgaaca ataccacaga agatatcitta ggaatggtac agattcccag gcaagagcta 840
aggaagctgt ggccaaatgc atcccaagcc attagcatag ctctcccaac cttgggggct 900
atcctgagag aagcccactt gcaaaatgtg agtcttccca gacaggtaaa tggctctggtg 960
ctatcagtgg ttttaccaga aaggltgcaa gaaatcatac tcaccttca aaagatcaat 1020
aaaacccgca atgccagagc ccagtgtgtt ggctggcact ccaagaaaag gagatgggat 1080
gagaaagcgt gccaaatgat gttggatatac aggaacgaag tgaaatgccg ctgtaactac 1140

```

```

accagtgtgg igatgtcttt ttccattctc atgtccctcca aatcgatgac cgacaaagtt 1200
ctggactaca tcacctgcat tgggcctcagc gtctcaatcc taagcttggg tctttgcctg 1260
atcattgaag ccacagtggg gtcccggtg gtgtgacgg agatatcata catgcgtcac 1320
gtgtgcatcg tgaatatagc agtgtccctt ctgactgcca atgtgtgggt tatcataggc 1380
tctcacttta acattaaggc ccaggactac aacatgtgtg ttgcagtac attttcagc 1440
cactttttct acctctctct gttttcttgg atgtctctca aagcattgct catcatttat 1500
ggaatattgg tcattttccg taggatgatg aagtcccgaa tgatgggcat tggctttgcc 1560
attggctatg ggtgcccatt gatcattgct gtcactacag ttgctatcac agagccagag 1620
aacggctaca tgagacctga ggctgttgg cttactggg acaataccaa agccctttta 1680
gcatttgcca tcccggcgtt cgtcattgtg gctgtaaatc tgatgttggg tttggttgtt 1740
gctgtcaaca ctacagaggc ctctattggc agttccaagt ctcaggatgt ggtcataatt 1800
atgaggatca gcaaaaatgt tgcctcctc actccactgc tgggactgac ctggggtttt 1860
ggaatagcca ctctcataga aggcacttcc ttgacgttcc atataatitt tgccttgctc 1920
aatgctttcc agggtttttt catcctgctg ttggaacca ttatggatca caagataaga 1980
gatgctttga ggatgaggat gtcttcactg aaggggaaat cgagggcagc tgagaatgca 2040
tcactaggcc caaccaatgg atctaaatta atgaatcgtc aagga 2085

```

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR18-3

&lt;400&gt; 7

tcctccttga cgattcatta atttag

26

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Primer TGR18TQF

&lt;400&gt; 8

ggcaagagct aaggaagctg tg

22

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer TGR18TQR

&lt;400&gt; 9

caccagacca ttacctgtc tgg

23

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Probe TGR18TQP for TaqMan PCR

&lt;400&gt; 10

ctatcctgag agaagccac ttgcaaatg

30

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 509

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 11

Met Val Lys Ser Ser Glu Thr Thr Ser Gly Asn Ile Ala Phe Ile Val

1

5

10

15

Glu Leu Leu Lys Asn Ile Ser Thr Asp Leu Ser Asp Asn Val Thr Arg

20

25

30

Glu Lys Met Lys Ser Tyr Ser Glu Val Ala Asn His Ile Leu Asp Thr

35	40	45
Ala Ala Ile Ser Asn Trp	Ala Phe Ile Pro Asn Lys	Asn Ala Ser Ser
50	55	60
Asp Leu Leu Gln Ser Val	Asn Leu Phe Ala Arg Gln	Leu His Ile His
65	70	75
Asn Asn Ser Glu Asn Ile	Val Asn Glu Leu Phe Ile	Gln Thr Lys Gly
85	90	95
Phe His Ile Asn His Asn	Thr Ser Glu Lys Ser Leu	Asn Phe Ser Met
100	105	110
Ser Met Asn Asn Thr Thr	Glu Asp Ile Leu Gly Met	Val Gln Ile Pro
115	120	125
Arg Gln Glu Leu Arg Lys	Leu Trp Pro Asn Ala Ser	Gln Ala Ile Ser
130	135	140
Ile Ala Phe Pro Thr Leu	Gly Ala Ile Leu Arg Glu	Ala His Leu Gln
145	150	155
Asn Val Ser Leu Pro Arg	Gln Val Asn Gly Leu Val	Leu Ser Val Val
165	170	175
Leu Pro Glu Arg Leu Gln	Glu Ile Ile Leu Thr Phe	Glu Lys Ile Asn
180	185	190
Lys Thr Arg Asn Ala Arg	Ala Gln Cys Val Gly Trp	His Ser Lys Lys
195	200	205
Arg Arg Trp Asp Glu Lys	Ala Cys Gln Met Met Leu	Asp Ile Arg Asn
210	215	220
Glu Val Lys Cys Arg Cys	Asn Tyr Thr Ser Val Val	Met Ser Phe Ser
225	230	235
Ile Leu Met Ser Ser Lys	Ser Met Thr Asp Lys Val	Leu Asp Tyr Ile
245	250	255
Thr Cys Ile Gly Leu Ser	Val Ser Ile Leu Ser Leu	Val Leu Cys Leu
260	265	270
Ile Ile Glu Ala Thr Val	Trp Ser Arg Val Val Val	Thr Glu Ile Ser
275	280	285
Tyr Met Arg His Val Cys	Ile Val Asn Ile Ala Val	Ser Leu Leu Thr
300	310	315
Asp Tyr Asn Met Cys Val	Ala Val Thr Phe Phe	Ser His Phe Tyr
320		

			325				330				335				
Leu	Ser	Leu	Phe	Phe	Trp	Met	Leu	Phe	Lys	Ala	Leu	Leu	Ile	Ile	Tyr
			340				345				350				
Gly	Ile	Leu	Val	Ile	Phe	Arg	Arg	Met	Met	Lys	Ser	Arg	Met	Met	Val
			355				360				365				
Ile	Gly	Phe	Ala	Ile	Gly	Tyr	Gly	Cys	Pro	Leu	Ile	Ile	Ala	Val	Thr
			370				375				380				
Thr	Val	Ala	Ile	Thr	Glu	Pro	Glu	Asn	Gly	Tyr	Met	Arg	Pro	Glu	Ala
385			390				395				400				
Cys	Trp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Thr	Lys	Ala	Leu	Leu	Ala	Phe	Ala	Ile
			405				410				415				
Pro	Ala	Phe	Val	Ile	Val	Ala	Val	Asn	Leu	Ile	Val	Val	Leu	Val	Val
			420				425				430				
Ala	Val	Asn	Thr	Gln	Arg	Pro	Ser	Ile	Gly	Ser	Ser	Lys	Ser	Gln	Asp
			435				440				445				
Val	Val	Ile	Ile	Met	Arg	Ile	Ser	Lys	Asn	Val	Ala	Ile	Leu	Thr	Pro
450			455				460								
Leu	Leu	Gly	Leu	Thr	Trp	Gly	Phe	Gly	Ile	Ala	Thr	Leu	Ile	Glu	Gly
465			470				475				480				
Thr	Ser	Leu	Thr	Phe	His	Ile	Ile	Phe	Ala	Leu	Leu	Asn	Ala	Phe	Gln
			485				490				495				
Val	Ser	Ser	Lys	Arg	Glu	Thr	Phe	Leu	Cys	Tyr	Ser	Asp			
			500				505								

$\langle 210 \rangle$	12
$\langle 211 \rangle$	1527
$\langle 212 \rangle$	DNA
$\langle 213 \rangle$	Human

<400> 12							
atgggtgaaat	catcagaaac	aacatctgga	aatattgcat	ttatagigga	gttattaaaa		60
aatattttcta	cagacttgtc	tgataatggt	actcgagaga	aaatgaagag	ctatagttaa		120
gtggccaacc	acatcctcga	cacagcagcc	atttcaaact	gggctttcat	tccaacaaa		180
aatgccagct	cggatttggt	gcagtcagtg	aatttgittg	ccagacaact	ccacatccac		240
aataattctg	agaacattgt	gaatgaactc	ttcattcaga	caaaggggtt	tcacatcaac		300
cataatacct	cagagaaaag	cctcaatttc	tccatgagca	tgaacaatac	cacagaagat		360



atcttaggaa tggtagagat tcccaggcaa gagctaagga agctgtggcc aaatgcatcc 420  
caagccatta gcatagcttt cccaaccttg ggggctatcc tgagagaagc ccacttgcaa 480  
aatgtgagtc ttcccagaca ggtaaatggc ctgggtgctat cagtgggttt accagaaagg 540  
ttgcaagaaa tcatactcac cttcgaaaag atcaataaaa cccgcaatgc cagagcccag 600  
tgtgttggct ggcactccaa gaaaaggaga tgggatgaga aagcgtgcca aatgatgttg 660  
gatatcagga acgaagtga atgccgtgt aactacacca gtgtgggtgat gtctttttcc 720  
attctcatgt cctccaaatc gatgaccgac aaagtctctg actacatcac ctgcatggg 780  
ctcagcgtct caatcctaag ctgtgttctt tgcctgatca ttgaagccac agtgtgtgctc 840  
cgggtgtgtg tgacggagat atcatacatg cgtcacgtgt gcatcgtgaa tatagcagtg 900  
tcccttctga ctgccaatgt gtgggtttatc ataggctctc actttaacat taaggcccag 960  
gactacaaca tgttgtttgc agtgacattt ttccagccact tttctacct ctctctgttt 1020  
ttctggatgc tcttcaaagc attgctcacc atttatggaa tatttggtcat tttccgtagg 1080  
atgatgaagt ccggaatgat ggtcattggc ttgccattg gctatgggtg ccatttgatc 1140  
attgcigtca ctacagttgc tatcacagag ccagagaacg gctacatgag acctgaggcc 1200  
tgttggctta actgggacaa taccaaagcc cttttagcat ttgccaatccc ggcgttcgtc 1260  
attgtggctg taaatctgat tgtgtttttg gttgttgctg tcaacactca gaggccctct 1320  
attggcagtt ccaagtctca ggatgtggc ataattatga ggatcagcaa aaatgttgcc 1380  
atcctcactc cactgctggg actgacctgg ggttttgaa tagccactct catagaaggc 1440  
acttccttga cgttcataat aatttttgcc ttgtcaatg ctttccaggt aagtccaag 1500  
aggagactt ttctgtgtta ctccgac 1527

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07833

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K14/075, C12N15/12, C12P21/02, A61K38/17, C07K16/28, G01N33/53,  
G01N33/15, A61K45/00, A61P25/00, C12Q1/68, G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K14/075, C12N15/12, C12P21/02, A61K38/17, C07K16/28, G01N33/53,  
G01N33/15, A61K45/00, A61P25/00, C12Q1/68, G01N33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 01/02563 A2 (Sagami Chemical Research Center), 11 January, 2001 (11.01.01), & AU 20052498 A	1-14, 17-19, 22-25, 27, 28, 33-41, 44-46, 49-51
A	WO 00/08053 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 17 February, 2000 (17.02.00), & EP 1103562 A & JP 2000-050875 A	1-14, 17-19, 22-25, 27, 28, 33-41, 44-46, 49-51
A	WO 00/15793 A2 (Incyte Pharmaceuticals, Inc.), 23 March, 2000 (23.03.00), & EP 1114155 A	1-14, 17-19, 22-25, 27, 28, 33-41, 44-46, 49-51
PA	WO 00/58462 A1 (Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.), 05 October, 2000 (05.10.00), & AU 200033276 A	1-14, 17-19, 22-25, 27, 28, 33-41, 44-46, 49-51

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22 November, 2001 (22.11.01)

Date of mailing of the international search report  
04 December, 2001 (04.12.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07833

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 26  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

It pertains to diagnostic methods to be practiced on the human body.

2. ☒ Claims Nos.: 15,16,20,21,29-32,  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Even though the statement in the description is taken into consideration concerning "ligand", "drug containing the ligand", "compound" and "drug characterized by containing the compound" as set forth in these claims, it is not mentioned what particular substances are involved in the scopes of the ligand and the compound. Namely, these claims are described in extremely unclear manner.

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Although three G protein-coupled receptor proteins, i.e., TGR18-2, TGR18-3 and TGR18-1 are described in the claims, the amino acid sequences of G protein-coupled receptor proteins have been reported in WO 00/08053, WO 00/15793, etc. and thus publicly known. Therefore, the "G protein-coupled receptor protein" common to the claims cannot be regarded as a "special technical feature".

Such being the case, three inventions including "an invention relating to TGR18-2", "an invention relating to TGR18-3" and "an invention relating to TGR18-1" are described in the claims.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The protest is accompanied by a fee and the applicant's request for a refund of the fee is pending.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/075, C12N15/12, C12P21/02, A61K38/17,  
C07K16/28, G01N33/53, G01N33/15, A61K45/00, A61P25/00  
C12Q1/68, G01N33/566

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/075, C12N15/12, C12P21/02, A61K38/17,  
C07K16/28, G01N33/53, G01N33/15, A61K45/00, A61P25/00  
C12Q1/68, G01N33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
SwissProt, PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO 01/02563 A2 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER) 11.01月.2001 (11.01.01) & AU 20052498 A	1-14, 17-19, 22-25, 27, 28, 33-41, 44-46, 49-51
A	WO 00/08053 A1 (武田薬品工業株式会社) 17.02月.2000 (17.02.00) & EP 1103562 A & JP 2000-050875 A	1-14, 17-19, 22-25, 27, 28, 33-41, 44-46, 49-51

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.11.01

国際調査報告の発送日

04.12.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4B

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/15793 A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 23.03月.2000 (23.03.00) & EP 1114155 A	1-14, 17-19, 22-25, 27, 28, 33-41, 44-46, 49-51
PA	WO 00/58462 A1 (萬有製薬株式会社) 05.10月.00 (05.10.00) & AU 200033276 A	1-14, 17-19, 22-25, 27, 28, 33-41, 44-46, 49-51

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 26 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
人間の診断方法である。
2. ☒ 請求の範囲 15, 16, 20, 21, 29-32, 42, 43, 47, 48 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで  
所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
同項に記載の「リガンド」「リガンドを含有してなる医薬」「化合物」「化合物を含有  
することを特徴とする医薬」について、明細書の記載を参酌しても、該リガンドや化合  
物が、具体的にどのような物質を包含するものか記載されていないから、同項の記載は  
著しく不明確である。
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に  
従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲には、TGR18-2、TGR18-3、TGR18-1の三種のGタンパク  
質共役型レセプター蛋白質が記載されているが、Gタンパク質共役型レセプター蛋白質のア  
ミノ酸配列は、WO 00/08053 A や WO 00/15793 A に記載されており、公知であることから、  
請求の範囲に共通する「Gタンパク質共役型レセプター蛋白質」は「特別な技術的特徴」で  
あるとはいえない。

したがって、請求の範囲には「TGR18-2に関する発明」「TGR18-3に関する  
発明」「TGR18-1に関する発明」の3発明が記載されている。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求  
の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追  
加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納  
付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載  
されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。